



<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 5/06 // (C12N 5/06, C12R 1:91)</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO97/01628</b>  <b>(43) 国際公開日</b> <b>1997年1月16日(16.01.97)</b>									
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP96/01764  <b>(22) 国際出願日</b> 1996年6月26日(26.06.96)  <b>(30) 優先権データ</b> <table border="0"> <tr> <td>特願平7/160382</td> <td>1995年6月27日(27.06.95)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平8/40889</td> <td>1996年2月28日(28.02.96)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平8/147158</td> <td>1996年6月10日(10.06.96)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 住友ベークライト株式会社 (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.)[JP/JP] 〒140 東京都品川区東品川二丁目5番8号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> 渡辺芳明(WATANABE, Yoshiaki)[JP/JP] 〒011 秋田県秋田市土崎港相染町字中島下27-4 秋田住友ベークライト株式会社内 Akita, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo, (JP)		特願平7/160382	1995年6月27日(27.06.95)	JP	特願平8/40889	1996年2月28日(28.02.96)	JP	特願平8/147158	1996年6月10日(10.06.96)	JP	<b>(81) 指定国</b> US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書
特願平7/160382	1995年6月27日(27.06.95)	JP									
特願平8/40889	1996年2月28日(28.02.96)	JP									
特願平8/147158	1996年6月10日(10.06.96)	JP									
<b>(54) Title: LIQUID MEDIUM FOR NERVE CELLS, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND METHOD FOR INCUBATING NERVE CELLS WITH THE USE OF THE SAME</b>  <b>(54)発明の名称</b> 神経細胞用培養液、その製造方法及びこれを用いる神経細胞の培養方法  <b>(57) Abstract</b> A liquid medium for nerve cells prepared by adding albumin to the culture supernatant of primary astroglia cells obtained by incubating the astroglia cells in a nutritional medium containing insulin and transferrin. By using the liquid medium, central nerve cells can be stably incubated. Thus, in low density incubation, synapses excellent in the elongation of axons can be quickly formed, while, in high density incubation, it is possible to provide cells forming a nervous network and being excellent in the stability over a prolonged storage.											

(57) 要約

本発明は、インシュリン及びトランスフェリンを添加した栄養培地を用いて培養し採取した初代アストログリア細胞の培養上清に、アルブミンを配合した神経細胞用培養液に関する。

この培養液を用いれば中枢神経細胞の培養を安定に行い、低密度培養では神経突起の伸展性に優れ迅速なシナプス形成を可能とし、高密度培養では神経ネットワークを形成した長期安定性に優れた細胞が提供できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LR	セリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LS	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
BB	バルバドス	GAB	ガボン	LV	ラトヴィア	SK	スロヴァキア
BE	ベルギー	GB	イギリス	MC	モナコ	SN	セネガル
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MD	モルドヴァ共和国	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TD	チャド
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	IL	イスラエル	MR	モリタニア	TR	トルコ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CH	スイス	JP	日本	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
CU	キューバ	KZ	カザフスタン				
CZ	チェコ共和国						

## 明 細 書

神経細胞用培養液、その製造方法及びこれを用いる神経細胞の培養方法

技術分野

本発明は、神経細胞の培養に用いるための培養液、当該培養液の製造方法、及びこれを用いる神経細胞の培養方法に関する。

背景技術

神経細胞を生体外で培養するために、古くから幾多の検討がなされてきた。神経成長因子（NGF）の発見は、神経細胞に特異的に働く因子のはじめての発見であり、神経生物学の分野に大きな影響を与えた。神経細胞の培養に於いても、神経繊維の成長が誘導できるようになり、より生体内に近い条件で培養できるようになった。

最近になって、毛様体神経栄養因子（CNTF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、神経栄養因子-3（NT-3）、神経栄養因子-4（NT-4）、神経栄養因子-5（NT-5）、グリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）と、次々に新しい神経成長因子が発見されてきた。これらは培養神経細胞によって、その効果や作用メカニズムが検討され、更には実用化されている遺伝子工学の手法により、疾病治療のための医薬としての利用も検討されるまでになっている。

しかし、これらの因子を通常の中枢神経細胞の培養系で調べてみると、単一物質の添加だけで各種の神経細胞に対して著しい効果を示すとは言いにくく、特定の細胞に対してのみ効果を示すという場合が多い。

中枢神経細胞の培養に関しては、これらとは別の流れとして、ホルモン（インシュリン、サイロキシン、プロジェステロン等）、ビタミン、不飽和脂肪酸、細胞成長因子（塩基性繊維芽細胞増殖因子等）などが検討され続けてきており、これらの因子を種々組み合わせた無血清培養液が報告されている〔ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス・メソッド（Journal of Neuroscience Methods, 23:75（1988）等）〕。

しかしこれらのものも、株化細胞（株化グリア細胞等）には効果的であるが、神経細胞に対しては安定培養ができない場合や、神経細胞には効果があるものの、同時にグリア細胞の増殖が促進されてしまい、いわゆるグリア細胞との混合培養系になってしまう場合など、神経細胞に対する薬理作用を検討する場合には不適切なものが多い。例えば、ボテンシュタイン（Bottenstein）らのN 2添加物（インシュリン（ $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ ）、トランスフェリン（ $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ ）、プロジェステロン（ $20 \text{ nM}$ ）、ブトレシン（ $100 \mu\text{M}$ ）、及び亜セレン酸塩（ $30 \text{ nM}$ ））〔プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proceeding of National Academy of Science, U.S.A.）, 76:514(1979)〕は、株化グリア細胞の培養には適しているが、初代神経細胞の場合は安定した細胞の生存維持が図れない。また、ブリュワー（Brewer）らの処方培養液〔ブレイン・リサーチ（Brain Research）, 65:494(1989)〕も、中枢神経細胞に対して短期間の培養は可能であるが、長期間に渡って培養した場合、細胞機能を安定して維持することができない。

また、神経細胞の培養に株化グリア細胞ないしは初代グリア細胞の培養上清を用いる方法が知られている。しかし、株化グリア細胞の培養上清を用いた場合は、一般的に、神経細胞に対しても作用するが、同時にグリア細胞にも作用し増殖が促進される。つまり神経細胞の生存に対する効果だけでなく、それ以上にグリア細胞に対して効果を示す。グリア細胞増殖因子と呼称される因子は、これらの培養上清より精製されている〔ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（Journal of Biological Chemistry）, 268:2857(1993)など〕。

また特開平7-101990号公報には株化グリア細胞であるアストロサイトーマの培養上清を濃縮したものが神経細胞の培養に30～50%の活性増加効果を示すことが報告されている。また、神経芽細胞腫の増殖を抑制することが示されている。これは株化グリア細胞の培養上清を用いた場合の欠点であるグリア細胞の増殖を抑えるため、培養上清を濃縮し一部の有効成分をとりだしたものである。しかし神経細胞を安定に培養するためには単一物質ではなく複数の成分による総合的な作用が必要である。この濃縮物を用いないものに比した活性増加効果が30%程度では、安定な神経細胞の培養系を構成することはできない。

初代グリア細胞を用いる方法では、培養上清を得るために、通常の無血清培養液ないしは血清が含まれている培養液を用いる。しかし、通常の無血清培養液を用いる培養上清の採取方法では、グリア細胞の生存に対して十分な培養液とはならず、安定培養ができない。このため培養上清に含まれる神経細胞に作用する因子群の量が少なく、神経細胞の培養に対して効果が低い。また培養上清の採取には限度があり、数回程度で、安定した効果を持つ培養上清の採取は難しくなる。血清含有培養液を用いた場合には、安定した培養上清の採取は行えるが、神経細胞を培養する際に、神経細胞よりも共存するグリア細胞に対して増殖因子が作用し細胞増殖が促進される。その結果、神経細胞の安定培養が障害される。

通常、無血清培養液にはホルモン等の栄養因子を加える方法が採られる。例えば、特開平3-66700号公報には、ダルベッコ改変イーグル培地（以下DMEMと略す）培養液にインシュリン（ $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ ）、トランスフェリン（ $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ ）、ハイドロコチゾン（ $20 \text{ nM}$ ）、及び3, 3', 5-トリヨード-L-チロニン（ $0.3 \text{ nM}$ ）を添加する培養法が開示されている。しかしこの培養上清を用いて神経細胞を培養しても数日間の培養しか行えず安定した培養を行うことができない。また、同じく神経突起伸展因子として明示されている $\alpha 2$ -マクログロブリンは、中枢神経の培養においては安定培養の効果が低く、主要な役割を果たすものではなく補助的役割を果たすにすぎないものである。

更に、特開平3-155777号公報には、ミクログリア細胞の産生する因子が、神経細胞の突起伸展に効果があることが示されている。ミクログリア細胞は、マクロファージ（貪食細胞）のような免疫系細胞の機能を示すといわれ、組織が障害を受けたときに活性化の度合いが高くなる。しかし、一般的に生体内では、アストログリア細胞を含むマクログリア細胞の比率が高く、炎症などの場合を除き、主としてマクログリア細胞が恒常性を維持していると考えられている。

上記のような従来の培養液群を中枢神経細胞の培養に用いた場合、その効果は低く、神経細胞の安定した培養を行うことができない。すなわち、神経薬理試験等を行った場合に於いて、期待する十分な結果が得られない。従って本発明は、神経細胞の培養におけるこのような現状に鑑みてなされたもので、神経細胞を長期間安定に培養できる培養液を提供することを目的とするものである。

### 発明の開示

本発明者らは神経細胞を安定に培養するためには種々の栄養因子が必要であると考え、これらの栄養因子に関して神経細胞の培養に与える効果を検討した。初代アストログリア細胞の培養上清も栄養因子の一つとし検討したが、これらの栄養素は単独の使用ではその効果が低い。特に、初代アストログリア細胞の培養上清は、神経細胞の安定培養に対して、これまで報告されて来た程の効果が無い事が明らかになった。そこで本発明者らは、栄養因子を複数をを用いることによる複合効果、相乗効果の検討をすすめ、種々の培養効果について鋭意研究を進めた結果、本発明を完成するに至ったものである。

すなわち、本発明は（Ａ）インシュリン及びトランスフェリンを添加した栄養培地中で初代アストログリア細胞を培養して採取した培養上清に、（Ｂ）アルブミンを配合したことを特徴とする神経細胞用培養液を提供するものである。

また、本発明は初代アストログリア細胞を動物血清を添加した培地中で培養、増殖させた後、インシュリン及びトランスフェリンを添加した栄養培地中で培養し、その上清を採取し、得られた培養上清にアルブミンを添加することを特徴とする上記の神経細胞用培養液の製造方法を提供するものである。

更にまた、本発明は、上記神経細胞用培養液中で神経細胞を培養することを特徴とする神経細胞の培養方法を提供するものである。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明の神経細胞用培養液を調製するには、まず動物の脳よりアストログリア細胞を採取し、初代アストログリア細胞を増殖させて充分量の初代アストログリア細胞を得る。動物の脳よりアストログリア細胞を採取するには、動物の新生仔（１～２日）の脳より採取するのがよい。ここでアストログリア細胞採取用の動物としては、ラット、マウス、ウシ、ウマ、ブタ、サル、ウサギ、ニワトリ等が挙げられるが、ラット又はマウスが好ましい。

具体的には、新生仔の脳より大脳を切り出し、脳膜を除いた後、トリプシン、ディスパーゼ、コラゲナーゼ、パパイン等の酵素を用いて細胞を分散させる。これらの中でも特にトリプシン 0.05～0.35 w/v %（以下、単に％で

示す)を用いるのが好ましい。この酵素に更に、デオキシリボヌクレアーゼ 0.01% (100~500 U/ml) や、エチレンジアミン-N, N, N', N'-四酢酸 (EDTA) 0.01%を加える方法も効果的である。

採取されたアストログリア細胞の培養、増殖は動物血清を添加した培地中で行うのが好ましい。ここで用いられる動物血清としては、ウシ血清が好ましく、ウシ胎児血清、仔ウシ血清、新生仔ウシ血清が特に好ましい。また、動物血清の添加量は5~20%となる量が好ましい。また、培地としては、動物細胞培養用の栄養培地であれば特に制限されず、イーグルの最小必須培地 (以下、MEMと略す)、ダルベッコ改変イーグル培地 (以下、DMEMと略す)、DMEM/ハムのF-12培地 (以下、F-12と略す)、F-12、ハムのF-10培地 (以下、F-10と略す) などの培地を用いることができる。DMEM/F-12混合培地は混合比を各種変えたものが用いられるが、両培地の特徴を合わせ持つ、60/40~40/60 (重量比) 程度の範囲の混合培地が特に好ましい。

培養液に分散したアストログリア細胞は、細胞培養用のフラスコ、ディッシュ、プレート、もしくはポリリジンコートをしたフラスコ、ディッシュ、プレートやマイクロキャリアなどを用いて、コンフルエントに (培養面全体に密に) なるまで培養し、増殖させる。培養面積は、新生仔1に対して10~100 cm<sup>2</sup> とするのが好適である。そして、更に継代培養を行うが培養面積は2~10倍程度が適当である。同様にコンフルエントになるまで培養する。このコンフルエントになった細胞は主として1型アストログリア (又は1型アストロサイト) に分類されるものである。1型アストログリアであることは免疫細胞化学染色を行うことにより確認できる。この細胞は抗GFAP (グリア繊維性酸性蛋白質) 抗体で染色され、抗A2B5抗体 (抗シアル酸含有糖蛋白質抗体) で染色されない。

細胞がコンフルエントの状態になった時点で培養液を除去し、リン酸塩緩衝液等で洗浄する。

かくして得られた初代アストログリア細胞を、インシュリン及びトランスフェリンを添加した栄養培地中で培養し、その上清を採取する。ここで用いられる栄養培地としては、MEM、DMEM、F-10及びF-12から選ばれる1種又は2種以上が挙げられるが、MEM、DMEM、DMEM/F-10又

はDMEM/F-12が好ましく、DMEM/F-12が特に好ましい。更にDMEM/F-12は60/40~40/60（重量比）の混合比のものが好ましい。

これらの栄養培地にはインシュリン及びトランスフェリンを添加するが、更に亜セレン酸又はその塩を添加するのがより好ましい。ここでインシュリンは1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは3~20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるように添加される。トランスフェリンは1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは3~20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるように添加される。また、亜セレン酸の塩としては、亜セレン酸ナトリウム、亜セレン酸カリウム等が挙げられる。亜セレン酸又はその塩は1~100 nM、特に3~50 nMの濃度となるように添加するのが好ましい。インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸塩はいずれも水溶性であり、そのまま添加してもよいが、各成分を混合した高濃度溶液を調製しておき、その一定量加えるのも好ましい方法である。

培養期間は1日程度でよく、上清を採取した後、再び新しい培地及び添加剤を加えて培養を行えば、上清を繰り返し採取することが出来る。このようにして1日毎に上清を採取すれば、初代アストログリア細胞の1回の準備操作で、10回以上、15回程度まで上清を採取することが可能である。

採取した培養上清は、孔径0.02~0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターにより濾過滅菌し、細胞片などを除いて用いるのが好ましい。

この培養上清のみを培養液として用いても神経細胞の安定培養はできない。アルブミンを添加することにより安定培養が可能となる。当該アルブミンに加えてプロジェステロンを添加するのがより好ましい。ここでアルブミンは0.5~2.5  $\text{mg}/\text{ml}$ の濃度となるように添加するのが好ましく、プロジェステロンは1~100 nMの濃度となるように添加するのが好ましい。

また、培養上清中のインシュリン、トランスフェリン及び亜セレン酸又はその塩の濃度が低い場合には、インシュリン1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、トランスフェリン1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、亜セレン酸又はその塩1~100 nMとなるように添加するのが好ましい。

更に、前記培養上清中にはスーパーオキシドジスムターゼとカタラーゼの組み



合わせ、及び／又は $\alpha$ -トコフェロール類を添加するのがより好ましい。これらの添加剤の好ましい濃度は、スーパーオキシドジスムターゼ1～100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、カタラーゼ1～100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $\alpha$ -トコフェロール類1～100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。ここで $\alpha$ -トコフェロール類としては $\alpha$ -トコフェロール、酢酸トコフェロール、コハク酸トコフェロール等の $\alpha$ -トコフェロールエステルが挙げられる。

このように前記培養上清にアルブミン及びその他の添加剤を加えた培養液では、神経細胞を安定に培養することが可能で、従来の培養液に見られた低密度培養時の不安定性も改善され、高い安定性を示す。

また、前記培養上清には、神経細胞の栄養源として新たに前記の培地を添加してもよく、より好ましい培地としてはDMEM/F-12混合培地が挙げられる。新たに加える培地の添加量は0～75%、特に0.1～50%になる量が好ましい。

特に好ましい添加剤の組み合わせとしては、アルブミン、プロジェステロン、インシュリン、トランスフェリン及び亜セレン酸又はその塩；当該5種と $\alpha$ -トコフェロール類との組み合わせ；当該5種とスーパーオキシドジスムターゼ及びカタラーゼとの組み合わせ；当該5種と $\alpha$ -トコフェロール類、スーパーオキシドジスムターゼ及びカタラーゼとの組み合わせ；並びにこれらの組み合わせにDMEM/F-12混合培地を添加したもの、等が挙げられる。

培養上清への上記添加剤の添加の方法は、プロジェステロンとして水溶性プロジェステロン、 $\alpha$ -トコフェロールとして水溶性 $\alpha$ -トコフェロールを用いれば、前記と同様に各成分を混合した高濃度溶液として添加する方法が適用できる。また、非水溶性プロジェステロン、非水溶性 $\alpha$ -トコフェロールを用いる場合は、エタノールにあらかじめ溶解したものを用いればよい。

培養上清は凍結することにより安定に保存することが可能である。そこで前記のように1日毎に繰り返して上清を採取する場合は、その都度インシュリン等の添加剤を加えるのではなく、凍結して保存しておき、複数回分の上清の採取が終わった時点で凍結した培養上清を融解し、全体を均一に混合し、これと上記の添加剤を混合すれば、より均質な神経細胞用培養液を得ることができる。この添加剤はあらかじめ溶液状に溶解したものを加える方がよい。

添加剤は純水ないしは、リン酸塩緩衝液等の水溶液に溶解し凍結保存すれば安定に使用が可能である。プロジェステロン、 $\alpha$ -トコフェロールなどの、非水溶性の成分はエタノール等に溶解し同様に凍結保存すればよい。また、このようにして調製した本発明の培養液も凍結して安定に保存することができる。培養上清、上記の添加剤、混合した培養液いずれも凍結保存温度は $-10 \sim -80^{\circ}\text{C}$ が適しており、冷蔵温度( $4 \sim 8^{\circ}\text{C}$ )では長期間の安定保存は難しい。また凍結融解の操作は繰り返さないことが好ましい。

本発明の培養液を用いて神経細胞の培養を行うには、この培養液に神経細胞を添加し常法に従い、培養すればよい。神経細胞は、初代アストログリア細胞と同様の動物から細胞を調製することが可能である。生後の個体を用いても培養は可能であるが、一般的に胎児を用いた方が神経細胞の生存率は高くなる。ラットでは胎生15～20日程が好適であるが、より未熟な胎児を使用することも可能である。脳の特定領域、例えば、海馬、線条体、中隔野あるいは中脳、小脳などに限定しての培養も可能である。小脳の場合は神経細胞の分化にあわせた生後1週間ほどの個体を用いると効果的な培養が可能である。

脳を酵素処理し神経細胞を分散した場合には、通常、神経細胞の他にグリア細胞等(初代アストログリア細胞など)が混入してくる。初代アストログリア細胞には1型と2型があるが、血清添加培養液の場合には、このなかで1型アストログリア細胞が増殖し問題となる。しかし本発明の培養液にはこの細胞の増殖を抑える効果がある。初代アストログリア細胞の形態からの1型、2型の判別は確実とはいえ、免疫細胞化学染色法による判別方法を用いる。抗GFAP抗体では1型、2型両方が染色されるが、抗A2B5抗体では2型のみが染色される。この染色性の違いにより1型と2型の判別が可能である。

胎児の脳を用いた場合は未分化細胞の混入の比率が高くなる。本発明の培養液は、この未分化な幹細胞の一つであるオリゴデンドログリア(又はオリゴデンドロサイト)－2型アストログリア(又は2型アストロサイト)幹細胞(以下O-2A幹細胞)の増殖分化を誘導する効果がある。培養を継続すると、培養系に、当初認められなかったオリゴデンドログリアを認めることができるようになる。これはO-2A幹細胞が増殖、分化したものである。オリゴデンドログリアであ

ることは、アストログリア細胞を判別する場合と同様の免疫細胞化学染色の方法で適用できる。例えば抗GC（ガラクトセレブロシド）抗体、抗MBP（ミエリン塩基性蛋白質）抗体などを用いて染色すると明確な判別が可能である。

具体的な神経細胞の培養方法は、先ず前記と同様にして脳を切り出す。そしてトリプシン、パパイン、ディスパーゼなどの酵素を用いて神経細胞分散液を調製する。好ましくはパパイン（10～50 U/ml）を用いる方がよい。パパインを溶解したリン酸塩緩衝液にL-システイン（0.5～5 mM）、グルコース（5～50 mM）を加え、37℃で30～120分、脳組織を酵素処理する。分散酵素液を丁寧に攪拌、混和することにより神経細胞を分散させる。デオキシリボヌクレアーゼ（0.01%）を更に添加した方が漏出した核酸による細胞の凝集を防ぐことができる。

次に、遠心分離機により細胞を分離し、前記のように調製した本発明の培養液を用いて10,000～2,000,000 cells/mlの細胞液を調製し、培養用のプレート、ディッシュなどを用いて、37℃の5%炭酸ガスインキュベーターで培養する。培養に用いるプレート、ディッシュ等は、ガラス、プラスチック等材質は問わないが、ポリリジシン、ポリオルニチン、ポリアリルアミン、プロタミン、ラミニン、コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、テネイシン、及びこれらを混和したものを、単層ないしは複層コートしたものをを用いるのが良い。

### 実施例

以下、実施例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1、比較例1～2

##### （1）培養液の調製

ウイスター系ラットの新生仔（生後1日）3匹の脳より大脳を切り出し、0.25%のトリプシン/リン酸塩緩衝液（フロウ・ラボラトリー社製）を用いて37℃で30分酵素処理した。酵素液を除き、10%牛胎児血清（ハイクローン社製）及びゲンタマイシン（シグマ社製）50 µg/mlを含むDMEM/F-

1 2 等比混合培養液（ライフ・テクノロジー社製）で組織を分散させ、細胞分離用遠心機（クボタ社製）により 9 0 0 回転、5 分の条件で細胞を遠心分離した。

分離した細胞は、1 5 ml の同じ培養液を加え 7 5 cm<sup>2</sup> の培養フラスコ（住友ベークライト社製）を用いて、3 7 °C、5 % の炭酸ガスインキュベーター内で 1 0 日間培養した。培養液を除き、フラスコ内にコンフルエントに増殖した細胞を、リン酸塩緩衝液で洗浄した後、0. 2 5 % のトリプシン／リン酸塩緩衝液で、3 7 °C で 5 分間酵素処理した。ここで再び同じ培養液 1 5 0 ml を加えて細胞を分散させ、同様に遠心分離し 1 5 0 ml の培養液に再分散させた後、これを 2 2 5 cm<sup>2</sup> の培養フラスコ（住友ベークライト社製）3 個に分けて、1 0 日間培養した。なお、培養液は 2 ～ 3 日に 1 回新しいものと交換した。

培養液を除去し、リン酸塩緩衝液で 2 回洗浄した後、インシュリン（5 μg / ml）、トランスフェリン（5 μg / ml）、亜セレン酸ナトリウム（5 nM）（いずれもシグマ社製）を添加した DMEM / F - 1 2 等比混合培養液を加えて、1 日間培養し、その培養上清を全量採取して、再び同じ培養液を加えた。同様の操作を 1 0 日間（1 0 回）繰り返した。比較例 1 として、上記の添加物を加えずに、同様に操作して培養上清を採取した。尚、培養液の量は、培養器の形態により適宜増減することが可能であるが、プレート、フラスコ、ディッシュ、トレーなどでは、培養面積当たりでは 0. 1 5 ～ 0. 3 5 ml / cm<sup>2</sup> の範囲とするのが適切である。

採取した培養上清は、0. 2 2 μm フィルター（ミリポア社製）で濾過滅菌して凍結保存し、1 0 回分の上清を採取した後、解凍し全体をまとめて均一に混合した。これに、アルブミン（ALBUMAX™ I、ライフ・テクノロジー社製、2. 5 mg / ml）を加え、- 7 0 °C で保存した。

## （2）神経細胞の培養試験

試料となる神経細胞は、胎生 1 7 日のラットより大脳を切り出し、1 mM システイン、2 5 mM グルコース、1 mg / ml アルブミン（各シグマ社製）を含有するリン酸塩緩衝液で、2 0 U / ml に調製した、パパイン（ワージントン社製）を用いて 3 7 °C で 4 5 分酵素処理した。酵素液を除き、DMEM / F - 1 2 混合培養液で細胞を分散させた後、7 0 0 回転、5 分の遠心分離条件で細胞を分離した。

(1) で得られた本発明の培養液を用いて、600,000 c/ml の細胞濃度の溶液を調製し、ポリリジンコート24ウェルプレート（住友ベークライト社製）を用いて0.5 ml/ウェルで培養した。比較例2としては、本発明の培養液を加えないDMEM/F-12液等比混合培養液を用いて、同じ条件で培養を行った。

4日間培養した後、顕微鏡下で細胞の形態を観察した。本発明の培養液を用いたものは、良好な生存と長い神経突起の伸展が観察され、シナプスを形成する突起間のコンタクトがたいへん多く認められた。しかし、比較例1の培養液を用いたものでは、神経突起の伸展が著しく劣っており、死細胞と思われる形態をしているものが多く認められた。また、比較例2の培養液では、生存細胞は認められなかった。

更に、生細胞と死細胞の比率を求めるため、リン酸塩緩衝液に溶解し培養液に加えた二酢酸フルオレセイン（シグマ社製）10  $\mu$ g/mlと、ヨウ化プロピジウム（シグマ社製）15  $\mu$ g/mlとを反応させた。蛍光顕微鏡（オリンパス光学社製）で異なった蛍光を発する生細胞と死細胞の比率を測定したところ、本発明の培養液で培養したサンプルでは、生存率は80%以上の良好な値を示した。

#### 実施例2、比較例3

実施例1と同様にして初代アストログリア細胞を培養し、培養上清を採取した。得られた培養上清を用いて、培養上清とDMEM/F-12等比混合培養液の比率が75/25、50/50、25/75、及び10/90になるようにそれぞれ調製し、その全体量に対して、プロジェステロン（20 nM）及びアルブミン（2.5 mg/ml）（いずれもコラボレイティブ・リサーチ社製）の添加物を、各溶液に加えて培養液を調製した。更に、比較例3として、DMEM/F-12等比混合液にウシ胎児血清（ハイクロン社製）10%を加えたものを用いた。実施例1と同様にして神経細胞液を500,000 c/mlの濃度に調製し、実施例1と同様にして培養を行った。

4日間培養した後、顕微鏡下で観察したところ、培養上清とDMEM/F-12混合液の比を75/25、及び50/50とした培養液では、神経細胞の良好な生存維持と神経突起の伸展が観察された。25/75の培養液では、生存細

胞数がやや少なく、10/90の培養液では、生存細胞、神経突起の伸展のいずれも劣っていた。また、比較例3のウシ胎児血清を用いた培養液では、生存している神経細胞の数が少なく、グリア細胞の存在が多く認められた。

培養上清とDMEM/F-12混合液の比が75/25の培養液で培養したもの、及び比較例3の血清添加で培養したものについて、神経細胞であることを確認するため、抗MAP2抗体（ベーリンガー・マンハイム社製）による免疫組織化学染色を行った。培養液を除きリン酸塩緩衝液で洗浄した後パラフォルムアルデヒド（和光純薬社製）4%のリン酸塩緩衝液で20分、トリトンX-100（ベーリンガー・マンハイム社製）の0.1%リン酸塩緩衝液を20分、ヒツジ血清1%のリン酸塩緩衝液を20分、順次反応させ、更に、抗MAP2抗体をリン酸塩緩衝液で5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製し、30分間反応させた。なお、反応はいずれも室温で行い、各反応後にはリン酸塩緩衝液で洗浄した。

次にABC免疫組織化学キット（ベクター社製）、及びDAB基質キット（ベクター社製）で染色を行った。その結果、前記の形態観察から神経細胞と判断された細胞は大半が染色され、神経細胞であることが確認された。しかし、比較例3の血清添加で培養した方の細胞は染色される細胞が少なく、形態からグリア細胞と判断されるものは染色されなかった。

#### 実施例3、比較例4

実施例1と同様にして神経細胞用培養液を調製した。試料となる神経細胞は、ウイスター系ラットの胎児（胎生16日）の海馬より、実施例1と同様にして調製した。24ウェルラミニンコートプレート（住友ベークライト社製）に250,000 c/ウェルの細胞を加え、14日間培養した。培養3～5日の間は、シトシンアラビノフラノシド（シグマ社製）を5  $\mu\text{M}$  加えた。培養液の交換は1/2量を週2度交換した。また、比較例4として、DMEM/F-12等比混合培養液に、インシュリン（5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、トランスフェリン（5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、プロジェステロン（20 nM）、及び亜セレン酸ナトリウム（20 nM）を加えたが、アルブミンを加えないものを用いて、同様にして培養を行った。

培養14日の時点で観察したところ、比較例4の培養液を用いた方は細胞が全て死滅していたが、本発明の培養液を用いた場合では、神経細胞間の緊密なネッ

トワーク形成が観察された。

#### 実施例 4

##### (1) 培養液の調製

実施例 1 と同様にして初代アストログリア細胞を培養し、培養上清を採取した。これに、インシュリン  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、トランスフェリン  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、スーパーオキシドジスムターゼ  $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、カタラーゼ  $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、亜セレン酸ナトリウム  $100 \text{ nM}$ 、プロジェステロン  $20 \text{ nM}$ 、酢酸トコフェロール  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、アルブミン  $2.5 \text{ mg}/\text{ml}$  (いずれもシグマ社製) で各栄養因子を加え培養液を調製し、 $-70^\circ\text{C}$  で保存した。

比較のための培養液として、上記の培養上清に栄養因子を加えないもの (前記比較例 1 と同じ) を、また培養上清に栄養因子としてインシュリン  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、トランスフェリン  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、プロジェステロン  $20 \text{ nM}$  及び亜セレン酸ナトリウム  $100 \text{ nM}$  を添加したが、アルブミンを加えない培養液 (前記比較例 4 と同じ) を調製した。

##### (2) 神経細胞の培養試験

試料となる神経細胞は、胎生 17 日のラットより大腦を切り出し、 $1 \text{ mM}$  システイン、 $25 \text{ mM}$  グルコース、 $1 \text{ mg}/\text{ml}$  アルブミン (各シグマ社製) を含有するリン酸塩緩衝液で、 $20 \text{ U}/\text{ml}$  に調製したパパイン (ワーシントン社製) 液  $5 \text{ ml}$  を用いて  $37^\circ\text{C}$  で 45 分酵素処理した。酵素液を除き、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  のゲンタマイシンを含む DMEM/F-12 混合培養液で細胞を分散させた後、700 回転、5 分の遠心分離条件で細胞を分離した。上記実施例、比較例培養液で調製した神経細胞は、 $500 \text{ cells}/\text{mm}^2$  の培養密度で、ポリリジンコート 48 ウェルプレート (住友ベークライト社製) を用いて培養した。

4 日間培養した後、顕微鏡下で細胞の形態を観察した。本発明の培養液を用いたものは、生細胞数が多く、また長い神経突起の伸展が観察された。しかし比較例 1 の培養液で神経突起を伸長した良好な生存状態の細胞は認められず、比較例 2 の培養液では、一部の細胞が認められるのみであった。MTT (臭化 3-(4, 5-ジメチル-2-チアゾリル)-2, 5-ジフェニル-2H テトラゾリウム) 細胞増殖測定キット (ケミコン・インターナショナル社製) を用いて神経

細胞の生存度合いを測定した。実施例の培養液と比較例の培養液との比率は比較例 1 / 実施例 4 は 5 % 以下で、比較例 2 / 実施例 4 は 20 % 程であり、本発明の培養液に比べ、比較例の培養液は、著しく効果が劣っていた。

#### 実施例 5、比較例 5

実施例 4 と同様にして初代アストログリア細胞を培養し、培養上清を採取した。得られた培養上清を用いて、培養上清と DMEM / F-12 等比混合培養液の比率が、75 / 25、50 / 50、25 / 75、及び 10 / 90 になるようにそれぞれ調製し、その全体量に対して、インシュリン 5  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、トランスフェリン 5  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、スーパーオキシドジスムターゼ 2.5  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、カタラーゼ 2.5  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、亜セレン酸ナトリウム 100 nM、プロジェステロン 20 nM、酢酸トコフェロール 1  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、アルブミン 2.5  $\text{mg} / \text{ml}$  (いずれもシグマ社製) の添加物を、各溶液に加えて培養液を調製した。更に、比較のために DMEM / F-12 等比混合液にウシ胎児血清 (ハイクローン社製) 10 % を加えたもの (前記比較例 3 と同じ) を用いた。実施例 1 と同様にして神経細胞液を調製し、300 cells /  $\text{ml}$  の培養密度でポリリジンコート 24 ウェルプレート (住友ベークライト社製) で培養した。

4 日間培養した後、顕微鏡下で観察したところ、培養上清と DMEM / F-12 混合液の比を 75 / 25、50 / 50、とした培養液では、75 / 25 の方がより優っていたが、いずれも良好な生存維持と神経突起の伸張が観察された。25 / 75 では生存細胞は認められたが数が少なかった。10 / 90 の培養液では、生存細胞は認められなかった。また、比較例のウシ胎児血清を用いた培養液では、生存している神経細胞の数が少なく、グリア細胞の存在が多く認められた。

#### 実施例 6、比較例 6

実施例 4 と同様にして培養液を調製した。比較例として比較例 3 の培養液を使用した。実施例 1 と同様に神経細胞液を調製し、200 cells /  $\text{mm}^2$  の培養密度でラミニンコート 12 ウェルプレート (住友ベークライト社製) を用い、8 日間培養した。

本発明の培養液を用いたものは、安定に培養された神経細胞の他に、形態からオリゴデンドログリアと判断される細胞が認められた。また比較例の方は神経細



胞はわずかであり、形態からアストログリア細胞と判断される細胞が大半であった。

グリア細胞の種類を確認するため、抗GC抗体（ベーリンガーマンハイム社製、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製）、抗GFAP抗体（ベーリンガーマンハイム社製、 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製）、抗A2B5抗体（ベーリンガーマンハイム社製、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製）を用いて免疫細胞化学染色を行った。培養液を除きリン酸塩緩衝液で洗浄した後パラフォルムアルデヒド（和光純薬社製）4%のリン酸塩緩衝液で20分、トリトンX-100（ベーリンガーマンハイム社製）の0.1%リン酸塩緩衝液を20分、ヒツジ血清1%のリン酸塩緩衝液を20分、順次反応させ、更に上記抗体をそれぞれ30分間反応させた。各抗体の反応は比較例、実施例各1ウェルずつ計6ウェル、いずれも室温で行い、各反応液にはリン酸塩緩衝液で洗浄した。

次に、ABC免疫組織化学キット（ベクター社製）、及びDAB（3, 3'-ジアミノベンジジン）基質キット（ベクター社製）で染色を行った。本発明の培養液を用いたもので、形態からオリゴデンドログリアと判断される細胞はこの細胞と反応する抗GC抗体で染色された。

一方、比較例の形態からアストログリア細胞と判断される細胞は、抗GFAP抗体で染色され、抗A2B5抗体には染色されないことから1型アストログリア細胞と判断された。

#### 産業上の利用可能性

本発明による神経細胞用培養液を用いることにより、中枢神経細胞の培養を安定に行うことができ、低密度培養においては神経突起の伸展性に優れ迅速なシナプス形成が可能であり、高密度培養においては神経ネットワークを形成した細胞の長期安定性に優れている。これにより神経薬理試験、神経情報伝達試験等を確度高く実施することができ、神経薬理、衛生化学などの分野で痴呆症、神経疾患、神経毒性などの研究、病態の解明等に役立つ。

## 請 求 の 範 囲

1. (A) インシュリン及びトランスフェリンを添加した栄養培地中で初代アストログリア細胞を培養して採取した培養上清に、(B) アルブミンを配合したことを特徴とする神経細胞用培養液。
2. 栄養培地中に、更に亜セレン酸又はその塩を添加するものである請求項1記載の神経細胞用培養液。
3. 栄養培地が、イーグルの基本培地 (MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、ハムのF-10培地、及びハムのF-12培地から選ばれる1種又は2種以上である請求項1又は2記載の神経細胞用培養液。
4. (B) アルブミンに加えて、プロジェステロンを配合したものである請求項1～3のいずれか1項記載の神経細胞用培養液。
5. (B) アルブミンに加えて、プロジェステロン、インシュリン、トランスフェリン及び亜セレン酸又はその塩を配合したものである請求項1～3のいずれか1項記載の神経細胞用培養液。
6. (B) アルブミンに加えて、プロジェステロン、インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸又はその塩、スーパーオキシドジスムターゼ及びカタラーゼを配合したものである請求項1～3の何れか1項記載の神経細胞用培養液。
7. (B) アルブミンに加えて、プロジェステロン、インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸又はその塩及び $\alpha$ -トコフェロール類を配合したものである請求項1～3のいずれか1項記載の神経細胞用培養液。
8. (B) アルブミンに加えて、プロジェステロン、インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸又はその塩、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ及び $\alpha$ -トコフェロール類を配合したものである請求項1～3のいずれか1項記載の神経細胞用培養液。
9. 更に栄養培地を培養上清に配合するものである請求項4～8のいずれか1項記載の神経細胞用培養液。
10. 初代アストログリア細胞を動物血清を添加した培地中で培養、増殖させた後、インシュリン及びトランスフェリンを添加した栄養培地中で培養し、その上清を採取し、得られた培養上清にアルブミンを添加することを特徴とする請求項

1 記載の神経細胞用培養液の製造方法。

1 1. 栄養培地中に、更に亜セレン酸又はその塩を添加するものである請求項

1 0 記載の神経細胞用培養液の製造方法。

1 2. 栄養培地が、イーグルの基本培地 (MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、ハムの F-10 培地、及びハムの F-12 培地から選ばれる 1 種又は 2 種以上である請求項 1 0 又は 1 1 記載の神経細胞用培養液の製造方法。

1 3. アルブミンに加えて、プロジェステロンを添加するものである請求項 1 0 ～1 2 のいずれか 1 項記載の神経細胞用培養液の製造方法。

1 4. アルブミンに加えて、プロジェステロン、インシュリン、トランスフェリン及び亜セレン酸又はその塩を添加するものである請求項 1 0 ～1 2 のいずれか 1 項記載の神経細胞用培養液の製造方法。

1 5. アルブミンに加えて、プロジェステロン、インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸又はその塩、スーパーオキシドジスムターゼ及びカタラーゼを添加するものである請求項 1 0 ～1 2 の何れか 1 項記載の神経細胞用培養液の製造方法。

1 6. アルブミンに加えて、プロジェステロン、インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸又はその塩及び  $\alpha$ -トコフェロール類を添加するものである請求項 1 0 ～1 2 のいずれか 1 項記載の神経細胞用培養液の製造方法。

1 7. アルブミンに加えて、プロジェステロン、インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸又はその塩、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ及び  $\alpha$ -トコフェロール類を添加するものである請求項 1 0 ～1 2 のいずれか 1 項記載の神経細胞用培養液の製造方法。

1 8. 更に栄養培地を培養上清に添加するものである請求項 1 3 ～1 7 のいずれか 1 項記載の神経細胞用培養液の製造方法。

1 9. 請求項 1 ～9 のいずれか 1 項記載の神経細胞用培養液中で神経細胞を培養することを特徴とする神経細胞の培養方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01764

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N5/06 // (C12N5/06, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N5/06 // (C12N5/06, C12R1:91)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yamashita, N. et al. "Primary culture of postnatal rat hypothalamic neurons in astrocyte-conditioned medium", Brain Research (1992), Vol. 594, p. 215-220	1 - 19
A	JP, 5-111381, A (Biomaterial Research Institute Co., Ltd.), May 7, 1993 (07. 05. 93) (Family: none)	1 - 19
P,A	JP, 7-227278, A (Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.), August 29, 1995 (29. 08. 95) & EP, 668348, A	1 - 19
A	Kawahara, F. et al. "Primary culture of postnatal rat suprachiasmatic neurons in serum-free supplemented medium", Brain Research (1994) Vol. 651, p. 101-107	1 - 19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

September 6, 1996 (06. 09. 96)

Date of mailing of the international search report

September 17, 1996 (17. 09. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 5/06 // ( C12N 5/06, C12R 1:91 )

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 5/06 // ( C12N 5/06, C12R 1:91 )

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Yamashita, N. et al. "Primary culture of postnatal rat hypothalamic neurons in astrocyte-conditioned medium", Brain Research (1992) 第594巻, p. 215-220	1-19
A	JP, 5-111381, A (株式会社バイオマテリアル研究所) 7.5月.1993 (07.05.93) ファミリーなし	1-19
P, A	JP, 7-227278, A (杏林製薬株式会社) 29.8月.1995 (29.08.95) & EP, 668348, A	1-19
A	Kawahara, F. et al. "Primary culture of postnatal rat suprachiasmatic neurons in serum-free supplemented medium", Brain Research (1994) 第651巻, p. 101-107	1-19

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.09.96

国際調査報告の発送日

17.09.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B 9 2 8 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

